



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05304972 A**(43) Date of publication of application: **19.11.93**

(51) Int. Cl.

**C12P 17/06**  
**///(C12P 17/06 , C12R 1:01 )**
(21) Application number: **04077461**(22) Date of filing: **31.03.92**(30) Priority: **26.02.92 JP 04 39562**(71) Applicant: **mitsubishi kasei corp**
(72) Inventor: **NAGASAWA TORU**  
**YASUDA MARI**  
**OGISHI HARUYUKI**  
**SATO KATSUTOSHI**  
**MORIMOTO HIRONORI**
**(54) PRODUCTION OF 6-HYDROXY**  
**NITROGEN-CONTAINING 6-MEMBERED RING**  
**COMPOUND**

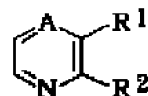
compound expressed by formula II.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&amp;Japio

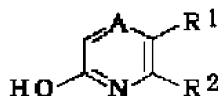
(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the subject compound in which the chemical synthesis of a synthetic intermediate for medicines, agricultural chemicals, dyes, etc., is difficult by reacting a specific nitrogen-containing 6-membered ring compound with a microorganism or a treated substance of its microbial cell in an aqueous medium.

CONSTITUTION: A nitrogen-containing 6-membered ring compound expressed by formula I ( $R^1$  is carboxyl, carbamoyl, cyano, formyl, 1-5C hydroxyalkyl, etc.;  $R^2$  is H or carboxyl; A is C or N) is made to react with a microbial cell (treated substance) of a microorganism, etc., selected from those belonging to the genres *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bordetella*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Erwinia*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Sarcina*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* and *Micrococcus* in an aqueous medium to afford the objective 6-hydroxy nitrogen-containing 6-membered ring



I



II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-304972

(43) 公開日 平成5年(1993)11月19日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/06		8931-4B		
// (C 1 2 P 17/06				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁)

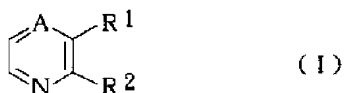
(21) 出願番号	特願平4-77461	(71) 出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成4年(1992)3月31日	(72) 発明者	長沢 透 愛知県名古屋市昭和区陶生町2-15 陶生 宿舍B22
(31) 優先権主張番号	特願平4-39562	(72) 発明者	安田 磨理 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
(32) 優先日	平4(1992)2月26日	(72) 発明者	大岸 治行 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 三 菱化成株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物の製造方法

(57) 【要約】

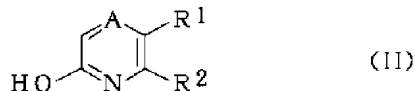
【構成】 下記一般式 (I)

【化1】



(Aは炭素原子または窒素原子) で表される含窒素6員環化合物に微生物菌体またはその菌体処理物を水性媒体中で作用させることを特徴とする下記一般式 (II)

【化2】



で表される6-ヒドロキシ含窒素化合物の製造方法。

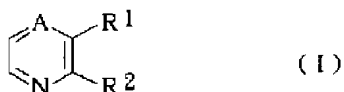
【効果】 本発明方法によれば、従来有機化学的合成が困難とされていた6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物を効率よく得ることができる。

1

【特許請求の範囲】

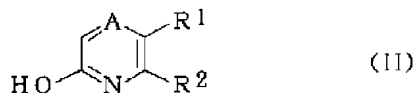
【請求項1】 下記一般式 (I)

【化1】



(上記一般式 (I) 中、 $R^1$  はカルボキシル基、カルバモイル基、シアノ基、ホルミル基、炭素数1～5のヒドロキシアルキル基、炭素数2～6のアルコキシカルボニル基、カルボキシビニル基、カルボキシメチル基またはオキシム基を表し、 $R^2$  は水素原子またはカルボキシル基を表し、Aは炭素原子または窒素原子を表す。但し、 $R^2$  が水素原子を表し、Aが炭素原子を表すとき、 $R^1$  はカルボキシル基を表さない。) で表される含窒素6員環化合物に、アグロバクテリウム属、アルスロバクテリウム属、ボルデテラ属、プレバクテリウム属、シュウドモナス属、アクロモバクテリウム属、コマモナス属、エルウィニア属、バクテリウム属、コリネバクテリウム属、セラチア属、サルシナ属、キサントバクテリウム属、アルカリゲネス属、フラボバクテリウム属およびマイクロコッカス属に属する微生物から選ばれる微生物菌体またはその菌体処理物を水性媒体中で作用させることを特徴とする、下記一般式 (II)

【化2】



(上記一般式 (II) 中、 $R^1$ 、 $R^2$  およびAは上記一般式 (I) 中で定義したとおり。) で表される6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

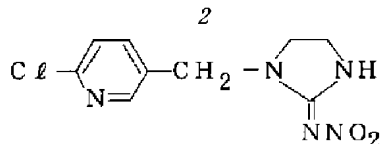
【産業上の利用分野】 本発明は、6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物の製造方法に関し、詳細には医薬、農業、染料等の重要な合成中間体である6-ヒドロキシピリジン誘導体および6-ヒドロキシピラジン誘導体を、微生物反応を利用して製造する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ジヒドロピリジン化合物や、ニコチン酸等の各種含窒素6員環化合物は、医薬、農業、染料等の分野における重要な合成中間体である。例えば近年、新しい殺虫剤としてニコチン酸レセプターに作用する農業の開発が進められている。下記構造にて表されるimidacloprid (日本特殊農薬) はかかる農薬の一つであり、3-クロロメチル-6-クロロピリジンは、その合成中間体として重要な物質である。

【0003】

【化3】



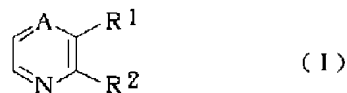
【0004】 従来より、ピリジンの3位および6位に置換基を有する化合物の合成法が種々検討されてきた。しかし有機化学的方法により3位が置換されたピリジン化合物の6位にのみ選択的に置換基を導入する方法はまだ見出されていない。また、シュウドモナス属、バシルス属またはアクロモバクテリウム属のニコチン酸分解能を有する微生物の作用によりニコチン酸の6位にヒドロキシ基を導入する方法が知られているが (特開昭60-196193号公報および同60-196194号公報)、他の3-置換含窒素6員環化合物についての報告はまだされていないのが現状であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題点につき鑑み検討を重ねた結果、特定の微生物の作用により3-置換含窒素6員環化合物の6位に選択的にヒドロキシ基を導入できることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。即ち本発明の要旨は、下記一般式 (I)

【0006】

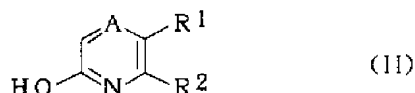
【化4】



【0007】 (上記一般式 (I) 中、 $R^1$  はカルボキシル基、カルバモイル基、シアノ基、ホルミル基、炭素数1～5のヒドロキシアルキル基、炭素数2～6のアルコキシカルボニル基、カルボキシビニル基、カルボキシメチル基またはオキシム基を表し、 $R^2$  は水素原子またはカルボキシル基を表し、Aは炭素原子または窒素原子を表す。但し、 $R^2$  が水素原子を表し、Aが炭素原子を表すとき、 $R^1$  はカルボキシル基を表さない。) で表される含窒素6員環化合物に、アグロバクテリウム属、アルスロバクテリウム属、ボルデテラ属、プレバクテリウム属、シュウドモナス属、アクロモバクテリウム属、コマモナス属、エルウィニア属、バクテリウム属、コリネバクテリウム属、セラチア属、サルシナ属、キサントバクテリウム属、アルカリゲネス属、フラボバクテリウム属およびマイクロコッカス属に属する微生物から選ばれる微生物菌体またはその菌体処理物を水性媒体中で作用させることを特徴とする、下記一般式 (II)

【0008】

【化5】



【0009】 (上記一般式 (II) 中、 $R^1$ 、 $R^2$  および

3

Aは上記一般式(I)中で定義したとおり。)で表される6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物の製造方法に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。本発明にて製造される6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物は、上記一般式(II)で表される。 $R^1$ にて定義される炭素数1~5のヒドロキシル基としては、ヒドロキシメチル基、1-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、4-ヒドロキシブチル基等が挙げられ、炭素数2~6のアルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、 $n$ -プロポキシカルボニル基、 $i$ -プロポキシカルボニル基、 $n$ -ブトキシカルボニル基等が挙げられる。

【0010】上記一般式(I)で表される含窒素6員環化合物としては、ニコチンアミド、3-シアノピリジン、キノリン酸、ニコチンアルデヒド、ピラジンアミド等が挙げられ、本発明方法により対応する6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物が製造される。本発明では、アグロバクテリウム属(*Agrobacterium*)、アースロバクター属(*Arthrobacter*)、ボルデテラ属(*Bordetella*)、ブレヴィバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シュウドモナス属(*Pseudomonas*)、アクロモバクター属(*Achromobacter*)、コマモナス属(*Comamonas*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、バクテリウム属(*Bacterium*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、セラチア属(*Serratia*)、サルシナ属(*Sarcina*)、キサントバクター属(*Xanthobacter*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、フラボバクテリウム属(*Flavobacterium*)およびミクロコッカス属(*Micrococcus*)に属する微生物から選ばれる微生物の菌体またはその菌体処理物を使用する。かかる微生物としては、上記一般式(I)で表される含窒素6員環化合物の6位に選択的にヒドロキシル基を導入する能力を有するものであれば特に制限はされない。

【0011】*Agrobacterium*属に属する微生物としては、*Agrobacterium radiobacter*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Agrobacterium viscosum*などが挙げられる。具体的には、*Agrobacterium radiobacter* NRR L B-11291 (Agricultural Research Service Culture Collection)、*Agrobacterium tumefaciens* IAM 13129 (東京大学応用微生物研究所)、*Agrobacterium viscosum* IFO 13652 (財団法人 醗酵研究所)等が挙げられる。

【0012】*Arthrobacter*属に属する微生物としては、*Arthrobacter globif*

4

*ormis*、*Arthrobacter fragilis*などが挙げられる。具体的には、*Arthrobacter globiformis* IFO 12137 (財団法人 醗酵研究所)、*Arthrobacter fragilis* EFRM P-4350 (工業技術院微生物工業技術研究所)等が挙げられる。

【0013】*Bordetella*属に属する微生物としては、*Bordetella bronchiseptica*などが挙げられる。具体的には、*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 (American Type Culture Collection)等が挙げられる。*Brevibacterium*属に属する微生物としては、*Brevibacterium butanicum*、*Brevibacterium ketoglutamicum*などが挙げられる。具体的には、*Brevibacterium butanicum* ATCC 21196 (American Type Culture Collection)、*Brevibacterium ketoglutamicum* ATCC 15587 (American Type Culture Collection)等が挙げられる。

【0014】*Pseudomonas*属に属する微生物としては、*Pseudomonas dacunhae*、*Pseudomonas maltophilia*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Pseudomonas hydantoinophilum*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*などが挙げられる。具体的には、*Pseudomonas dacunhae* ATCC 13261 (American Type Culture Collection)、*Pseudomonas maltophilia* ATCC 13637 (American Type Culture Collection)、*Pseudomonas chlororaphis* IFO 3904 (財団法人 醗酵研究所)、*Pseudomonas hydantoinophilum* FERMP-4347 (工業技術院微生物工業技術研究所)、*Pseudomonas putida* ATCC 21244 (American Type Culture Collection)、*Pseudomonas fluorescens* IFO 3903 (財団法人 醗酵研究所)等が挙げられる。

【0015】*Achromobacter*属に属する微生物としては、*Achromobacter xerosis*などが挙げられる。具体的には、*Achromobacter xerosis* IFO 12668 (財団法人 醗酵研究所)等が挙げられる。*Comamonas*属に属する微生物としては、*Comamonas acidovorans*、*Comamonas testosteroni*などが挙げられる。具体的には、*Comamonas acidovorans* N CIMB 9289 (National Collections of Indust

5

rial And Marine Bacteria Ltd. )、Comamonas testosteroni ATCC 11996 (American Type Culture Collection) 等が挙げられる。

【0016】Erwinia属に属する微生物としては、Erwinia herbicolaなどが挙げられる。具体的には、Erwinia herbicola ATCC 21434 (American Type Culture Collection) 等が挙げられる。Bacterium属に属する微生物としては、Bacterium cyclo-oxydansなどが挙げられる。具体的には、Bacterium cyclo-oxydans ATCC 12673 (American Type Culture Collection) 等が挙げられる。

【0017】Corynebacterium属に属する微生物としては、Corynebacterium xerosisなどが挙げられる。具体的には、Corynebacterium xerosis NCTC 9755 (National Collection of Type Cultures) などが挙げられる。Serratia属に属する微生物としては、Serratia liquefaciens、Serratia marcescensなどが挙げられる。具体的には、Serratia liquefaciens IFO 12979 (財団法人 醗酵研究所)、Serratia marcescens IFO 3054 (財団法人 醗酵研究所)、Serratia marcescens IFO 12648 (財団法人 醗酵研究所) 等が挙げられる。

【0018】Sarcina属に属する微生物としては、Sarcina luteaなどが挙げられる。具体的には、Sarcina lutea ATCC 9341 (American Type Culture Collection) 等が挙げられる。Xanthobacter属に属する微生物としては、Xanthobacter flavusなどが挙げられる。具体的には、Xanthobacter flavus NCIMB 10071 (National Collections of Industrial And Marine Bacteria Ltd.) 等が挙げられる。

【0019】Alcaligenes属に属する微生物としては、Alcaligenes eutrophus、Alcaligenes aquamarinus、Alcaligenes faecalisなどが挙げられる。具体的には、Alcaligenes eutrophus ATCC 17699 (American Type Culture Collection)、Alcaligenes aquamarinus FERM P-4229 (工業技術院微生物工業技術研究所)、Alcaligenes faecalis IFO 13111 (財団法人 醗酵研究所) 等が挙げられる。

【0020】Flavobacterium属に属する

6

微生物としては、Flavobacterium suaveolens、Flavobacterium aminogenes、Flavobacterium arborescens、Flavobacterium dehydrogenans、Flavobacterium heparinumなどが挙げられる。具体的には、Flavobacterium suaveolens IFO 3752 (財団法人 醗酵研究所)、Flavobacterium aminogenes FERMP-3134 (工業技術院微生物工業技術研究所)、Flavobacterium arborescens IFO 3750 (財団法人 醗酵研究所)、Flavobacterium dehydrogenans ATCC 13930 (American Type Culture Collection)、Flavobacterium heparinum IFO 12017 (財団法人 醗酵研究所) 等が挙げられる。

【0021】Micrococcus属に属する微生物としては、Micrococcus varians、Micrococcus morrhuaeなどが挙げられる。具体的には、Micrococcus varians IAM 1314 (東京大学応用微生物研究所)、Micrococcus morrhuae IAM 1711 (東京大学応用微生物研究所) 等が挙げられる。

【0022】これらの微生物の培養に必要な栄養物としては、特に限られるものではなく、通常微生物の培養に用いられるものが利用される。たとえば、炭素源としては、グルコース、シュクロース、フラクトース、グリセロール、ソルビトール、糖蜜、澱粉加水分解物等の糖質、酢酸、フマル酸等の有機酸、等が利用される。窒素源としては、硝酸塩類、アンモニウム塩類、コーンステイープリカー、酵母エキス、肉エキス、酵母粉末、大豆加水分解液、綿実粉、ポリペプトン、ベントン等が挙げられる。無機塩としては、リン酸カリウム、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化ナトリウム等が利用できる。また酵素を誘導するために、培地中に鉄イオン、コバルトイオン、銅イオン等の無機塩類等を添加することも望ましい。

【0023】培養温度は20~40℃、好ましくは30~35℃、pHは4.0~9.0、好ましくは5.0~7.0で、通常20~24時間程度培養する。その際培養は好氣的に行い、十分に、例えばOD<sub>660</sub>で5~40程度に菌を成育する。本発明における「微生物菌体処理物」とは、微生物菌体の抽出物や微生物菌体の磨砕物、更にはそれらを硫酸分別、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等の公知の方法により分離精製したものを意味し、本発明においては、含窒素6員環化合物に微生物菌体自身(生菌体または乾燥菌体)を作用させてもよいし、あるいは微生物菌体処理物を作用させてもよい。

【0024】また上記の培養で得られた微生物菌体またはその菌体処理物を、ポリアクリルアミドゲル、光架橋性樹脂、寒天、カラギーナン等のゲルで包括固定化した後、含窒素6員環化合物と反応させることも可能である。菌体自身を作用させる場合、上記のようにして十分に菌を育成させた後、含窒素6員環化合物を添加する。含窒素6員環化合物の濃度は0.1重量%～飽和濃度、好ましくは1.0～5.0重量%の範囲で添加する。添加後、20～50℃、好ましくは30～40℃の温度で、pHは4.0～9.0、好ましくは5.0～7.0で、2～24時間、通常は20～24時間程度通気攪拌し、反応を行う。

【0025】菌体の処理物を作用させる場合、タンパク質重量で2～15mg程度の菌体抽出物または菌体磨砕物を含む0.01～1Mリン酸緩衝液(pH 6～9)等の溶液に、含窒素6員環化合物を上記範囲で添加、反応させる。微生物菌体またはその菌体処理物を固定化した場合は、上記の条件下で攪拌型反応槽内で含窒素6員環化合物と反応させるか、固定化物をカラムに充填して含窒素6員環化合物を含有する液を流通させる。

【0026】なお、本発明でいう水性媒体とは、水または酢酸バッファー、リン酸バッファー等の緩衝液を意味する。かかる水性媒体は、基質となる含窒素6員環化合物に対して過剰量存在することが好ましい。かくして得られる6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物は、反応物から公知の方法、たとえばメタノール、水等の溶媒で抽出し、ODS樹脂等によるカラムクロマトグラフィー等で精製することができる。

【0027】前述したように、本発明によって得られる3-シアノ-6-ヒドロキシピリジン等の6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物は、医薬、農業、染料等の合成中

間体として有用な物質であり、たとえば3-シアノ-6-ヒドロキシピリジンから農業の中間体である3-クロロメチル-6-クロロピリジンへは、公知の手法により容易に導くことができる。

#### 【0028】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、その要旨を越えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

10 酵母エキス1g、グリコース1g、 $K_2HPO_4$  0.3g、 $KH_2PO_4$  0.1g、 $FeSO_4$  1mg、 $MgSO_4$  50mg、 $MnSO_4$  1mgを水100mlに含有する栄養溶液をへそ付き三角フラスコに満たし120度において20分間殺菌した。30度に冷却した後に、別殺菌したインデューサーとしての3-シアノピリジン0.2g、 $CuSO_4$  1mgを添加した。普通寒天培地上で24時間培養した表-1に挙げた菌を1白金耳接種し、30度、24時間、160rpmのロータリーシェーカーで培養した。24時間後培養物を回収し、菌体を遠心分離によって分離した。分離された菌体をさらに0.02モル酢酸バッファー(pH5.5)に懸濁洗浄し、遠心分離によって分離し、バイオマスを得た。100ml反応器に1.0%3-シアノピリジン(pH5.5)を20ml入れ30度に加熱した。バイオマスを添加して、反応混合物を十分に攪拌した。24時間後に6-ヒドロキシシアノピリジンがそれぞれ得られた。反応生成物の確認はHPLC、IR、および $^1H$ -NMRの測定により行った。その結果を表-1に示す。

#### 【0029】

30 【表1】

表-1

菌 名	生成量(mg)
<u>Achromobacter xerosis</u> (IFO 12668)	2.0
<u>Agrobacterium radiobacter</u> (NRRL B-11291)	1.0
<u>Alcaligenes eutrophus</u> (ATCC 17699)	3.0
<u>Alcaligenes aquamarinus</u> (FERM P-4229)	2.0
<u>Alcaligenes faecalis</u> (IFO 13111)	2.0
<u>Arthrobacter globiformis</u> (IFO 12137)	3.0
<u>Arthrobacter fragilis</u> (FERM P-4350)	2.0
<u>Bacterium cyclo-oxydans</u> (ATCC 12673)	13.0
<u>Bordetella bronchiseptica</u> (ATCC 4617)	10.0
<u>Brevibacterium butanicum</u> (ATCC 21196)	12.0
<u>Brevibacterium ketoglutamicum</u> (ATCC 15587)	2.0
<u>Corynebacterium xerosis</u> (NCTC 9755)	19.0
<u>Erwinia herbicola</u> (ATCC 21434)	2.0
<u>Flavobacterium suaveolens</u> (IFO 3752)	1.0
<u>Micrococcus varians</u> (IAM 1314)	1.0
<u>Micrococcus morrhuae</u> (IAM 1711)	1.0
<u>Comamonas acidovorans</u> (NCIMB 9289)	72.0
<u>Comamonas testosteroni</u> (ATCC 11996)	24.0
<u>Pseudomonas dacunhae</u> (ATCC 13261)	12.0
<u>Pseudomonas maltophilia</u> (ATCC 13637)	19.0
<u>Pseudomonas chlororaphis</u> (IFO 3904)	1.0
<u>Pseudomonas hydantoinophilum</u> (FERMP-4347)	5.0
<u>Pseudomonas putida</u> (ATCC 21244)	1.0
<u>Sarcina lutea</u> (ATCC 9341)	3.0
<u>Serratia liquefaciens</u> (IFO 12979)	1.0
<u>Serratia marcescens</u> (IFO 3054)	1.0
<u>Serratia marcescens</u> (IFO 12648)	2.0
<u>Xanthobacter flavus</u> (NCIMB 10071)	1.0

【0030】 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 6.42 (1H, d,  $J_{4,5} = 9.9\text{Hz}$ , H-5), 7.67 (1H, dd,  $J_{4,5} = 9.9\text{Hz}$ ,  $J_{2,4} = 2.4\text{Hz}$ , H-4), 8.26 (1H, d,  $J_{2,4} = 2.4\text{Hz}$ , H-2), 12.40 (1H, bs, OH)

#### 【0031】実施例2

肉エキス1g, リンゴ酸1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g, ニコチン酸1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  500mgを水100mlに含有する栄養溶液 (pH7.0) を坂口フラスコに満たし120度において20分間殺菌した。30度に冷却した後に、別殺菌した金属液 (表-2に示す。) 2mlを添加した。普通寒天培地上で24時間培

養した *Serratia marcescens* (IFO 12648) および *Pseudomonas fluorescens* (IFO 3903) を1白金耳接種し、30度36時間、レシプロカルシェーカーで培養した。培養物を回収し、菌体を遠心分離によって分離した。分離された菌体をさらに0.1モルりん酸バッファー (pH7.0) に懸濁洗浄し、遠心分離によって分離し、菌体を得た。得られた菌体を超音波破碎し超遠心にかけた。沈殿物に0.3% Triton Xおよび0.1% Cetylpyridiniumchloride を加え氷上で1時間懸濁後再び超遠心を行った。上清を粗酵素液とした。沈殿物は同じ操作をもう一度行い上清をとり粗酵素液に加えた。粗

酵素液を DEAE Sephacel, Phenyl Sepharose, Butyl Toyopearl などのカラムクロマトグラフィーにより精製した。

【0032】 酵素液 100  $\mu$ l, 1.5mM DCIP (2,6-Dichloroindophenol), 0.1Mリン酸バッファー (pH7.0) 2.0ml, 100  $\mu$ l 3.0mM PMS (Phenazine Methosulfa\*

\*te) 100  $\mu$ l, 2mM~5Mの基質溶液 500  $\mu$ l を加え反応を開始する。30℃で1分反応後 600nmの吸光度の変化で反応量の測定をする。結果を表-3に示す。

【0033】

【表2】

表-2 金属溶液組成

金 属	/L of DW
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	400mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	40mg
KI	100mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200mg
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	400mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	400mg
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	200mg
HCl	20ml

【0034】

※ ※【表3】

表-3

Substrate	S.marcescences IFO 12648	P.fluorescens IFO 3903
	$\mu$ M	$\mu$ M
Nicotineamide	213	701
Pyrazine 2,3-dicarboxylic acid	19	3
Nicotinaldehyde	463	825
Pyridyl carbinol	72	857
Pyridyl propanol	N. D	7
Ethyl nicotinate	461	539
Quinolinic acid	39	15
Trans-3-(3-pyridyl)acrylic acid	206	0.3
3-Pyridyl acetic acid	91	47
Pyrazine amido	17	14
3-Pyridinealoxime	293	333
3-Cyanopyridine	33	11

N. D. : not determined

【0035】

【発明の効果】本発明方法によれば、微生物反応を利用して含窒素6員環化合物の6位に選択的にヒドロキシル

基を導入することにより、従来有機化学的合成が困難とされていた6-ヒドロキシ含窒素6員環化合物を効率よく得ることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 勝利  
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三  
菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 森本 裕紀  
神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三  
菱化成株式会社総合研究所内